مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1391، دوره چهارم، شماره چهاردهم، صفحه 46-39

بررسی اثر منابع کربنی و نیتروژنی بر روی رشد و تولید روغن تک یاخته ای توسط قارچ *Cunninghamella echinulata*

حامی کابوسی[1]، حمید رضا صمدلویی[2]، مرتضی آب سالان[3]

1- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات آیت ا... آملی، دانشکده کشاورزی، گروه میکروبیولوژی، آمل، ایران.
2- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات آیت ا... آملی، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، آمل، ایران.
3- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات آیت ا... آملی، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، آمل، ایران.
نویسنده مسؤول: دکتر حامی کابوسی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات آیت ا... آملی، دانشکده کشاورزی، گروه میکروبیولوژی، آمل. ایران. hkaboosi@gmail.com

دریافت: 91/7/4 پذیرش: 91/9/21

چکیده

زمینه و هدف: در میان قارچ های تولید کننده روغن، قارچ ***Cunninghamella echinulata*** به علت تولید مقادیر بیشتر روغن تک یاخته ای و اسید چرب گاما لینولنیک اسید به تازگی مورد توجه ویژه ای قرار گرفته است. هدف اصلی این تحقیق، بهینه سازی شرایط کشت برای تولید توده زیستی، روغن تک یاخته ای و گاما لینولنیک اسید توسط قارچ ***C. echinulata*** در تخمیر غوطه وری بود.

روش بررسی: تاثیر مقادیر مختلف منبع کربنی (گلوکز) و منبع نیتروژنی (پودر سویای بدون چربی) بر روی تولید توده زیستی، روغن و گاما لینولنیک اسید از قارچ ***C. echinulata*** با استفاده از روش آماری سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. منابع کربنی و نیتروژنی طی تخمیر غوطه وری در 5 سطح در نظر گرفته شد و از طرح مرکب مرکزی با 13 آزمایش استفاده شد.

یافته ها: بیشترین مقدار تولید روغن در غلظت گلوکز و پودر سویا به ترتیب 60 و 4/31 گرم بر لیتر به مقدار 25% و بیشترین میزان تولید توده زیستی در غلظت گلوکز و پودر سویا به ترتیب 80 و 20 گرم بر لیتر به مقدار 2/53 % بدست آمد. بیشترین میزان گاما لینولنیک اسید در غلظت گلوکز و پودر سویا به ترتیب 31/72 و 13/5 گرم بر لیتر به میزان 6/5% بدست آمد.

نتیجه‌گیری: شرایط بهینه برای تجمع روغن در قارچ ***C. echinulata***، محدود کردن میزان منبع نیتروژنی و افزایش منبع کربنی می باشد. روند افزایش توده زیستی و تولید روغن نشان داد که هنگامی رشد متوقف می شود، تولید روغن افزایش قابل توجه ای می یابد و در شرایطی که روند تخریبی توده زیستی شروع می شود، تجمع روغن نیز کاهش می یابد.

واژه‌های کلیدی:*Cuuninghamella echinulata* ، توده زیستی، روغن تک یاخته ای، گاما لینولنیک اسید.

www.SID.ir

مقدمه

اسیدهای چرب ضروری از مهمترین اجزاء غذائی مورد نیاز بدن می باشد. بدن انسان توانایی ساخت این نوع اسیدهای چرب که به صورت غیر اشباع با چند پیوند دوگانه می باشند را ندارد و این اسیدهای چرب باید از طریق مواد غذایی وارد بدن شوند (1). از مهمترین اسیدهای چرب ضروری می توان به لینولئیک اسید، آلفا لینولنیک اسید و گاما لینولنیک اسید اشاره کرد (2). گاما لینولنیک اسید توسط غیر اشباع کردن اسید لینولئیک حاصل می شود (3). در بین اسیدهای چرب ضروری، گاما لینولینک اسید به علت اهمیت قابل توجه آن در سلامتی انسان مورد توجه ویژه قرار گرفته است. این اسید چرب دارای اثرات مفید بسیاری شامل اثرات ضد التهابی و درمان اگزما، دیابت، التهاب مزمن و کاهش غلظت کلسترول خون می باشد. همچنین این اسید چرب باعث از بین رفتن سلول های سرطانی بدون آسیب رساندن به سلول های طبیعی می شود (3 و 4). از منابع مهم تهیه گاما لینولنیک اسید می توان به روغن بذر گل پامچال، گل گاوزبان، انگور فرنگی و شاه دانه اشاره کرد (3 و 5). با این حال میزان تولید گاما لینولنیک اسید از منابع گیاهان بسیار پایین می باشد، چرا که تولید گیاهی آن نیازمند کشت های وسیع و طولانی مدت گیاهان و همچنین محدودیت های فصلی رشد گیاه و نیز در بعضی از مواقع بازده کم تولید روغن می باشد (1و6). با توجه به محدود بودن میزان تولید این اسید چرب از منابع گیاهی، روغن های تک یاخته ای موسوم به Single Cell Oil به عنوان منابع جایگزین برای تولید اسیدهای چرب ضروری در نظر گرفته شده است (7 و 8). در حال حاضر هزینه تولید روغن های تک یاخته ای به دلیل بازده تولید سویه مولد میکروبی و همین طور فراهم نمودن سوبستراهای تخمیری لازم و مناسب، بالا می باشد. به علت این واقعیت ها و همچنین به دلیل ضرورت و اهمیت تولید روغن های تک یاخته ای، تحقیقات زیادی برای کاهش این هزینه ها با استفاده از انتخاب مناسب سویه مولد و سوبستراهای تخمیری و همین طور بهینه سازی شرایط تخمیر غوطه وری برای تولید روغن تک یاخته ای در حال انجام می باشد (5 و 6). قارچ های روغنی زیادی با استفاده از منابع مختلف کربنی و نیتروژنی جهت تولید روغن تک یاخته ای مورد بررسی قرار گرفته اند (7). قارچ های *Rhizopus stolonifer*، *Thamnidium elegans*، *Mortierella sp.*، *Mucor circinelloides* و به تازگی قارچ *Cunninghamella echinulata* از مهمترین قارچ های روغنی می باشند که به علت سرعت رشد و تکثیر و همچنین بازدهی مناسب روغن، تحقیقات فراوانی بر روی تولید روغن تک یاخته ای از آن ها انجام شده است (9 و 10). در این تحقیق توانایی تولید روغن تک یاخته ای و اسید چرب گاما لینولنیک اسید توسط قارچ *Cunninghamella echinulata* مورد بررسی قرار گرفت. هدف اصلی این تحقیق، بررسی منابع کربنی و نیتروژنی به منظور بهینه سازی شرایط محیط کشت تخمیر غوطه وری برای تولید توده زیستی، روغن تک یاخته ای و نیز گاما لینولنیک اسید توسط قارچ *C. echinulata* با استفاده از روش آماری سطح پاسخ (Response Surface Methodology) می باشد.

روش بررسی

مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق گلوکز تک آبه، محیط کشت Potato Dextrose Agar، N- هگزان، اسید کلریدریک و سود از شرکت مرک آلمان تهیه شد. سویای مورد استفاده در فرآیند تخمیر از کارخانه "به پاک" خریداری گردید و پس از خرد و الک شدن در دمای 20- درجه سانتی گراد نگه داری شد. قارچ *Cunninghamella echinulata* از بانک میکروبی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور با شماره IRAN 913 C خریداری شد.

روش نگهداری قارچ: قارچ *C. echinulata* بر روی محیط کشت PDA در پلیت در درجه حرارت 22°C و مدت زمان 7 روز کشت داده شد و سپس در یخچال با درجه حرارت 4°C نگهداری شد.

مایه تلقیح و کشت‌های اصلی: از سوسپانسیون میسلیومی برای تلقیح کشت‌های تولید محصول استفاده شد (11). منبع کربنی مورد استفاده، گلوکز و منبع نیتروژنی مورد استفاده، پودر سویای بدون چربی بود. برای تهیه سوسپانسیون میسلیومی، 100 میلی لیتر محیط کشت شامل گلوکز تک آبه به میزان 40 گرم بر لیتر و پودر سویا بدون چربی به میزان 20 گرم بر لیتر در ارلن های 500 میلی لیتری بافل دار تهیه شد و در درجه حرارت 121°C به مدت 15 دقیقه سترون گردید. سپس بوسیله آنس سترون و به روش کشت بافت، قارچ داخل محیط کشت تلقیح گردید و در درجه حرارت 26°C به مدت 72

www.SID.ir
Archive of SID

ساعت و 170 دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شد (12). محیط های کشت تولید محصول با توجه به روش آماری سطح پاسخ (طبق طرح آزمایشی) طراحی شد و در هر مرحله اجزاء مورد نیاز افزوده شد. pH ارلن های آماده شده با استفاده از محلول اسید کلریدریک و سود به 6 رسانیده شد و در اتوکلاو سترون شدند. سپس 3 تا 10% از مایه تلقیح (سوسپانسیون میسلیومی) به ارلن های بافل دار حاوی محیط های کشت تخمیری تولید محصول (جدول 1) افزوده شد و در انکوباتور شیکردار در دمای $26^{\circ}C$ با 170 دور بر دقیقه به مدت 10 روز قرار داده شد (11 و 13).

اندازه‌گیری وزن خشک سلولی: جداسازی توده زیستی توسط کاغذ صافی واتمن شماره 41 صورت گرفت. سپس برای اندازه‌گیری وزن خشک سلولی آنها را بر روی شیشه‌های ساعت قرار داده و به مدت 2 ساعت در آون با درجه حرارت $105^{\circ}C$ خشک شد (7 و 8).

استخراج چربی: برای استخراج چربی ها، توده زیستی خشک شده در هاون چینی خرد شد. سپس عمل استخراج روغن با استفاده از دستگاه سوکسله با حلال N– هگزان انجام گردید (14).

مشتق‌سازی اسیدهای چرب: برای تعیین و اندازه‌گیری اسیدهای چرب، در ابتدا چربی بایستی به اسیدهای چرب و گلیسرول تجزیه شود. سپس توسط عمل مشتق‌سازی، متیله شده و به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق شود. با توجه به عدم فراریت، اسیدهای چرب به مشتق‌های متیل استر به روش متکالف تبدیل شد (15).

تعیین و اندازه‌گیری اسیدهای چرب: اندازه گیری اسیدهای چرب با تزریق 0/2 میلی لیتر به دستگاه گاز کروماتوگرافی (مدل Unicam 4600 با ستون Chrompack نوع CP-WAX 52 CB و آشکارگر FID با گاز حامل هلیوم به میزان 2 میلی لیتر در دقیقه و با اسید چرب استاندارد C_{15}) دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به روش متکالف انجام شد (15).

طرح آزمایشی: برای بهینه‌سازی تولید روغن توسط قارچ از روش سطح پاسخ استفاده شد. در این مرحله عوامل کلیدی منبع کربنی (گلوکز) و منبع نیتروژنی (پودر سویا) در 5 سطح برای بررسی بیشتر در نظر گرفته شد. سطوح 5 سطح متغیر بترتیب 1/4142-، 1-، 0، 1 و 1/4142 بودند. بر این اساس، متغیر بهینه سازی گلوکز (با نماد X_1) در 5 سطح بترتیب 31/72، 40، 60، 80 و 88/21 (گرم در لیتر) و متغیر بهینه سازی پودر سویا (با نماد X_2) در 5 سطح بترتیب 4/31، 7، 13/5، 20 و 22/69 (گرم در لیتر) استفاده شدند. از طرح مرکب مرکزی (Central Composite) Design با 13 آزمایش و 2 تکرار که شامل 2 آزمایش در نقطه مرکزی است، استفاده شد (جدول 1). مقادیر مورد استفاده گلوکز (گرم در لیتر) و پودر سویا (گرم در لیتر) در طرح مرکب مرکزی برای مرحله بهینه‌سازی تولید روغن توسط قارچ نیز در جدول 1 آورده شده است.

نتایج آزمایش‌ها براساس معادله چند جمله‌ای درجه دوم تحلیل شد:

$$y = \alpha_0 + \sum_{j=1}^{k} \alpha_j X_j + \sum_{j=1}^{k} \alpha_{jj} X_j^2 + \sum \sum_{i<j} \alpha_{ij} X_i X_j$$

که در آن α_0، α_j، α_{jj} و α_{ij} به ترتیب ضریب‌های رگرسیون برای عرض از مبدا، خطی، مربعی (درجه دوم) و متقابل می‌باشد و X_i و X_j متغیرهای مستقل کد شده می‌باشند. ضریب‌های رگرسیون و منحنی‌های سطح پاسخ و کنتور توسط نرم‌افزار (Design Expert, USA) محاسبه و ترسیم شد.

یافته ها

نتایج حاصل از رشد، تولید روغن و گاما لینولنیک اسید توسط قارچ *C. echinulata* مقادیر تولید توده زیستی، روغن و اسید چرب گاما لینولنیک اسید توسط قارچ روغنی *C. echinulata* با استفاده از روش آماری سطح پاسخ از محیط کشت بهینه شده با گلوکز و پودر سویا در تخمیر غوطه وری مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج در جدول 1 آورده شده است.

همانطور که در جدول 1 دیده می شود با افزایش میزان گلوکز و پودر سویا میزان تولید توده زیستی افزایش و با افزایش میزان گلوکز و کاهش پودر سویا میزان تولید روغن افزایش می یابد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول 1. طراحی آزمایش ها و نتایج از دو متغیر اعمال شده بر روی سطح پاسخ در روش سطح پاسخ

نمونه	گلوکز (A)	پودر سویا (B)	میزان توده زیستی (درصد)	میزان روغن (درصد)	میزان لینولئیک اسید (درصد)	میزان گاما لینولنیک اسید (درصد)
1	60/00	22/69	2/20	10/50	40/00	3/00
2	80/00	20/00	2/53	12/00	31/00	3/00
3	60/00	13/50	1/76	13/10	31/00	5/70
4	40/00	20/00	2/00	7/00	38/00	6/00
5	60/00	13/50	1/75	13/5	31/00	5/70
6	60/00	13/50	1/70	13/00	32/00	5/80
7	60/00	4/31	0/87	25/00	25/00	2/00
8	40/00	7/00	1/00	20/00	29/00	5/00
9	31/72	13/50	1/16	11/00	28/00	6/50
10	60/00	13/50	1/72	13/20	31/00	5/80
11	80/00	7/00	1/25	18/00	24/00	6/00
12	60/00	13/50	1/73	13/10	31/00	5/60
13	88/28	13/50	2/10	17/00	36/00	4/00

ضرایب مدل چند جمله ای درجه دوم پس از تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار و حذف عبارت‌های غیرمعنی دار توسط روش Forward در نرم افزار بدست آمد و نتیجه حاصل معادله (1) و (2) می باشد.

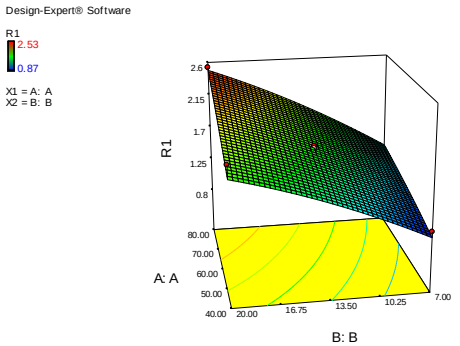
$$Y_1 = - 0/21254 + 0/012777 \times A + 0/092683 \times B + 5/38462E-004 A \times B - 5/71875E-005 \times A^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = + 38/17120 - 0/11107 \times A - 2/76805 \times B + 0/013462 A \times B + 9/37500E-006 \times A^2 \quad (2)$$

میزان Y1 و Y2 به ترتیب مربوط به درصد توده زیستی در وزن خشک سلولی و درصد روغن می باشد. A و B به ترتیب مربوط به میزان گلوکز و پودر سویا بر حسب گرم در لیتر است. بررسی پارامترهای آنالیز واریانس برای مدل های توده زیستی و روغن نشان داد که اثرات خطی پودر سویا و گلوکز در میزان تولید توده زیستی و روغن معنی‌دار می‌باشد ($P<0/05$). همچنین اثرات متقابل گلوکز و پودر سویا برای تولید روغن، معنی‌دار می‌باشد ($P<0/05$)، ولی برای توده زیستی، معنی‌دار نمی‌باشد ($P>0/05$). در مورد اثر درجه دوم بر تولید هیچکدام از عامل ها، معنی‌دار نمی‌باشد ($P>0/05$) و فقط اثر درجه دوم منبع نیتروژنی برای تولید روغن، معنی‌دار می‌باشد ($P<0/05$). معادله های 1 و 2 مدل رگرسیون را برای روغن در توده زیستی پس از تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم‌افزار Design Expert نشان می‌دهد. مقدار عددی ضریب تعیین (R^2) برای تولید روغن و توده زیستی به ترتیب 0/96 و 0/97 می باشد که نشان‌دهنده میزان انطباق داده‌ها در مدل رگرسیون می‌باشد و می‌توان چنین نتیجه گرفت که مدل‌های رگرسیون بخوبی توانسته رابطه بین شرایط کشت (گلوکز و پودر سویا) و میزان روغن و توده زیستی را نشان دهد و پیش‌بینی کند.

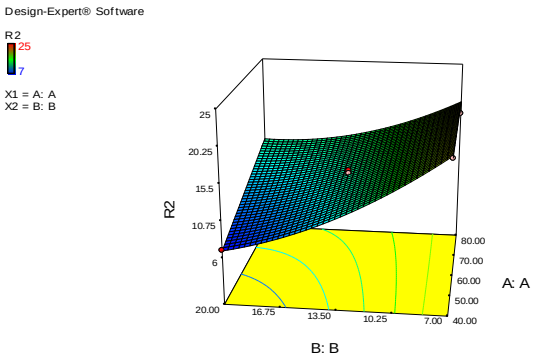
نتایج و تفسیر اثر غلظت گلوکز و پودر سویا بر عملکرد تولید توده زیستی: شکل حاصل از سطح پاسخ نشان می دهد که اثر غلظت منبع کربنی و نیتروژنی بر توده زیستی بصورت ماکزیمم ساده می باشد. سطح پاسخ نشان می دهد که هر چه میزان گلوکز و پودر سویا افزایش یابد، میزان تولید توده زیستی به طور همزمان در شرایط تعامل افزایش می یابد. اما افزایش غلظت پودر سویا تاثیر بسزایی در افزایش مقدار توده زیستی دارد. بیشترین مقدار تولید توده زیستی در غلظت گلوکز 80 گرم بر لیتر و پودر سویا 20 گرم بر لیتر به مقدار 2/53 % بدست آمد (شکل 1 سمت راست).

نتایج و تفسیر اثر غلظت گلوکز و پودر سویا بر عملکرد تولید روغن: منحنی سطح پاسخ تاثیر غلظت های منابع کربنی و نیتروژنی بر تولید روغن نشان می دهد که بیشترین مقدار تولید روغن در غلظت گلوکز 60 گرم بر لیتر و پودر سویا 4/31 گرم بر لیتر به مقدار 25% بدست آمد. سطح پاسخ نشان می دهد که با افزایش میزان گلوکز تا سطح 60 گرم بر لیتر و کاهش پودر سویا، میزان تولید روغن افزایش می یابد اما با افزایش گلوکز از سطح 60 گرم بر لیتر به بالا، به علت فشار اسمزی ایجاد شده، تولید روغن کاهش پیدا می کند. چنین استنباط می شود که افزایش گلوکز در بالاتر از سطح 60 گرم در لیتر با افزایش فشار اسمزی همراه بوده که تاثیر منفی در تولید روغن داشته است (شکل 1 سمت چپ).



Archive of SID

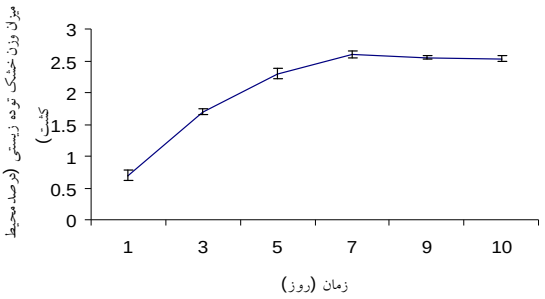
www.SID.ir



شکل 1. منحنی های سطح پاسخ برای تولید درصد توده زیستی (R1، سمت راست) و تولید درصد روغن (R2، سمت چپ) توسط *C. echinulata* با متغییرهای گلوکز (A) و پودر سویا (B)

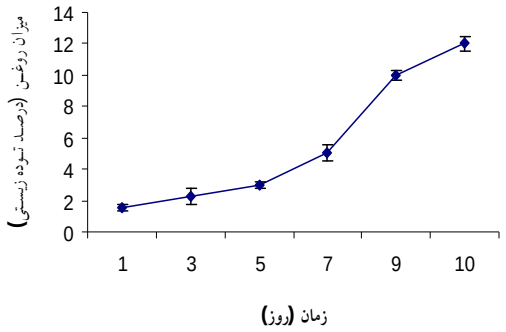
مقادیر بهینه پیش بینی شده و ارزیابی مدل رگرسیون تولید روغن و توده زیستی: به منظور ارزیابی مدل، شرایط پیش بینی شده مدل تولید روغن و توده زیستی در آزمون هایی با دو تکرار اعمال گردید. مقادیر بهینه پیش بینی شده با استفاده از نرم افزار Design Expert به منظور تولید روغن به ترتیب غلظت گلوکز 40 گرم بر لیتر و پودر سویا 7 گرم بر لیتر می باشد که میزان محصول 20/31 % می باشد. مقادیر بهینه پیش بینی شده به منظور تولید توده زیستی، به ترتیب غلظت گلوکز 80 گرم بر لیتر و پودر سویا 20 گرم بر لیتر می باشد که میزان محصول 2/49 % می باشد.

روند افزایش تولید توده زیستی و روغن در محیط بهینه تولید توده زیستی: نتایج نشان داد که در اوایل فرایند تخمیر روند افزایش تولید توده زیستی به صورت قابل توجه ای بالا بوده است. سپس این روند کاهشی شده و در انتهای فرایند تخمیر تولید توده زیستی روند ثابتی به خود گرفته و افزایش قابل توجه ای نیافته است (شکل 2).



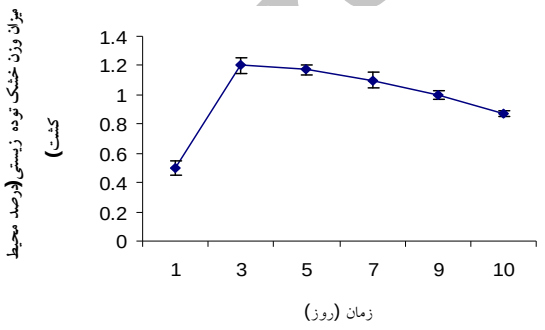
شکل 2. روند افزایش توده زیستی در شرایط بهینه تولید توده زیستی

نتایج روند تولید روغن (شکل 3) نشان داد که تولید روغن در اوایل فرایند تخمیر به صورت قابل توجه ای کند بوده است و در شرایطی که تولید توده زیستی متوقف می شود، تجمع روغن افزایش قابل توجه ای می یابد و در انتهای روند تولید کندتر می شود.



شکل3. روند افزایش روغن در شرایط بهینه تولید توده زیستی

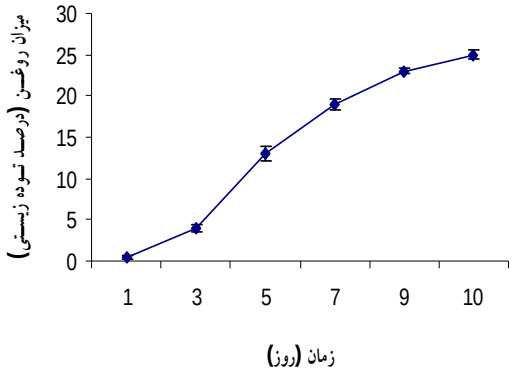
روند افزایش تولید توده زیستی و روغن در محیط بهینه تولید روغن: نتایج نشان داد که در اوایل فرایند تخمیر تولید توده زیستی افزایش قابل توجه ای یافته است و در این شرایط میزان اندکی روغن ذخیره شد. در ادامه فرایند تولید توده زیستی متوقف شد، که در این شرایط تجمع روغن به صورت قابل توجه ای افزایش یافته است. در انتهای فرایند تخمیر که تولید توده زیستی روند کاهشی پیدا کرده است و توده زیستی شروع به تخریب کرده است، که در این شرایط تجمع روغن کند می شود (شکل 4 و 5).



شکل 4. روند افزایش توده زیستی در شرایط بهینه تولید روغن

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 5. روند افزایش روغن در شرایط بهینه تولید روغن

نتایج و تفسیر اثر غلظت گلوکز و پودر سویا بر عملکرد تولید گاما لینولنیک اسید: نتایج نشان داد که افزایش تولید گاما لینولنیک اسید توسط *C. echinulata* به طور همزمان تحت تاثیر میزان غلظت گلوکز و پودر سویا نمی باشد. به عبارت دیگر بین میزان منابع کربنی (گلوکز) و نیتروژنی (پودر سویا)، در میزان درصد تولیدی گاما لینولنیک اسید رابطه مستقیمی وجود ندارد. همانطور که در جدول 1 مشاهده می شود، بیشترین میزان تولید گاما لینولنیک اسید در سطح کربن 31/72 گرم بر لیتر و نیتروژن 13/5 گرم بر لیتر به میزان 6/5% بدست آمد. در پایین ترین سطح گلوکز، بیشترین میزان تولید گاما لینولنیک اسید دیده می شود (جدول 1). چنین پیش بینی می شود که تجزیه روغن در انتهای مرحله رشد، باعث افزایش در میزان تولید گاما لینولنیک اسید شده است.

بحث

در این تحقیق، شرایط بهینه جهت تولید توده زیستی، روغن تک یاخته ای و گاما لینولنیک اسید در منابع کربنی (گلوکز) و نیتروژنی (پودر سویای بدون چربی) توسط قارچ *C. echinulata* بدست آمد. بیشترین مقدار تولید روغن در غلظت گلوکز 60 گرم بر لیتر و پودر سویا 4/31 گرم بر لیتر به مقدار 25% و بیشترین مقدار تولید توده زیستی در غلظت گلوکز 80 گرم بر لیتر و پودر سویا 20 گرم بر لیتر به مقدار 2/53 % بدست آمد. به طور کلی اسیدهای چرب عمده تولید شده در قارچ های روغنی، پالمتیک اسید، استئاریک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید و گاما لینولنیک اسید می باشد (16). در مورد سایر گونه های تولید کننده روغن مانند *Mortierella alpine* نیز روند تولید توده زیستی و روغن به همین شکل می باشد. افزایش تولید روغن در شرایط رشد به علت نیاز سلول به ساخت روغن و کاربرد آن در دیواره توده زیستی می باشد. همچنین، افزایش منبع نیتروژنی تاثیر قابل توجه ای در افزایش تولید توده زیستی و کاهش روغن دارد (17). در تحقیق مشابه ای نشان داده شد که با افزایش منبع کربنی (گلوکز) و منبع نیتروژنی (تارتارات آمونیوم)، تولید توده زیستی افزایش می یابد و با افزایش منبع کربنی (گلوکز) و کاهش منبع نیتروژنی (تارتارات آمونیوم)، میزان تولید روغن افزایش می یابد (18). سطح پاسخ نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش میزان منبع کربنی (گلوکز) تا سطح 60 گرم بر لیتر و کاهش منبع نیتروژنی (پودر سویا)، میزان تولید روغن افزایش می یابد. اما با افزایش منبع کربنی (گلوکز) از سطح 60 گرم بر لیتر به بالا به علت فشار اسمزی ایجاد شده، تولید روغن کاهش پیدا می کند. با افزایش میزان منابع کربنی (گلوکز) و نیتروژنی (پودر سویا)، میزان تولید توده زیستی افزایش می یابد. نتایج نشان داد که رابطه ای بین میزان منابع کربنی (گلوکز) و نیتروژنی (پودر سویا)، در میزان درصد تولیدی گاما لینولنیک اسید نمی باشد و بیشترین میزان تولید گاما لینولنیک اسید در سطح گلوکز 31/72 گرم بر لیتر و پودر سویا 13/5 گرم بر لیتر به میزان 6/5% بدست آمد. نتایج بدست آمده مشابه با نتایج Fakas و همکاران می باشد (5). آنها نیز نشان دادند که با افزایش منابع نیتروژنی (شامل گلوتن ذرت، ذرت خیسانده، آب پنیر و عصاره مخمر)، تولید توده زیستی افزایش و میزان تولید روغن کاهش می یابد. اما روند تولید گاما لینولنیک اسید متفاوت از افزایش یا کاهش منابع کربنی و نیتروژنی می باشد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج تحقیق می توان نتیجه گیری کرد که شرایط بهینه برای تجمع روغن در قارچ *C. echinulata*، محدود کردن غلظت منبع نیتروژنی و افزایش منبع کربنی -تا سطحی که دیواره قارچ تحت تاثیر فشار اسمزی قرار نگیرد - می باشد. همچنان روند افزایش توده زیستی و تولید روغن نشان داد که هنگامی رشد متوقف می شود، تولید روغن افزایش قابل توجه ای می یابد و در شرایطی که روند تخریبی توده زیستی شروع می شود، تجمع روغن نیز کاهش می یابد.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Chatzifragkou A, Makri A, Belka A, Bellou S, Mavrou M, Mastoridou M, Mystrioti P, Onjaro G, Aggelis G, Papanikolaou S. *Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species.* Energy 2011; 36:1097-1108.
2. Economou CN, Makri A, Aggelis G, Pavlou S, Vayenas V. *Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil.* Bioresource Technol. 2010; 101:1385-1388.
3. Chen HC, Liu TM. *Inoculum effects on the production of γ -linolenic acid by the shake culture of Cunninghamella echinulata CCRC 31840.* Enzyme Microb. Tech. 1997; 21:137-142.
4. Stredansky M, Conti E, Stredanska S, Zanetti F. *γ-Linolenic acid production with Thamnidium elegans by solid-state fermentation on apple pomace.* Bioresource Technol. 2000; 73:41-45.
5. Fakas S, Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Aggelis G. *Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in Cunninghamella echinulata.* J. Appl. Microbiol. 2008; 105:1062-1070.
6. Kaboosi H, Behbahani B. *An overview on effective parameters in production of single cell oils by microorganisms especially the fungus of Mortierella isabellina.* Annals of Biological Res. 2012; 3 (3):1650-1654.
7. Park EY, Koike Y, Higashiyama K, Fujikawa S, Okabe M. *Effect of nitrogen source on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of Mortierella alpina.* J. Bioscience Bioengin. 1999; 88:61-67.
8. Sakuradani E, Hirano Y, Kamada N, Nojiri M, Ogawa J, Shimizu S. *Improvement of arachidonic acid production by mutants with lower n-3 desaturation activity derived from Mortierella alpina 1S- 4.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004; 66:243-248.
9. Conti E, Stredansky M, Stredanska S, Zanetti F. *γ -Linolenic acid production by solid-state fermentation of mucorales strains on cereals.* Bioresource Technol. 2001; 76:283-286.
10. Ahmed SU, Singh SK, Pandey A, Kanjilal S, Prasad RBN. *Effects of various process parameters on the production o γ -Linolenic acid in submerged fermentation.* Food Technol. Biotechnol. 2006; 44(2):283-287.
11. Zhu M, Yu LJ, Wu YX. *An inexpensive medium for production of arachidonic acid by Mortierella alpina.* J. Indust. Microbiol. Biotechnol. 2003; 30:75-79.
12. Singh A, Ward OP. *Production of high yields of arachidonic acid in fed batch system by Mortierella alpine ATCC 32222.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997; 48:1-5.
13. Zhu M, Zhou PP, Yu LJ. *Extraction of lipid from Mortierella alpina and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids.* Bioresource Technol. 2002; 84:93-95.
14. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. *A simple method for the isolation of total lipids from animal tissues.* J. Biol. Chem. 1957; 226:497-506.
15. Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. *Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis*. Analytic. Chem. 1996; 38:514-515.
16. Fakas S, Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Aggelis G. *Lipids of Cunninghamella echinulata with emphasis to γ-linolenic acid distribution among lipid classes*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006; 73:676-683.
17. Samadlouie HR, Hamidi Z, Alavi Soltani M, Sahari MA, Abbasi S. *Statistical approach to optimization of fermentative production of oil and arachidonic acid from Mortierella alpine CBS 754.68*. Afr. J. Microbiol. Res. 2012; 6(7):1559-1567.
18. Muhid F, Kader A, Yusoff W, Omran O, Hamid A. *Optimization of ammonium tartrate and glucose concentration for gamma linolenic acid production by Cunninghamella sp. 2A1*. Sains malaysiana 2010; 39(6):891-899.

Archive of SID

www.SID.ir